

温泉医学領域に於ける濾紙分析法の研究

(II). 濾紙-Chromatographyによる血液コバルトに関する研究

岡山大学温泉研究所 (指導: 森永 寛 教授)

石 橋 丸 応

目 次

I. 血液コバルトの一新定量法

- [1]. 緒 言
- [2]. 原 理
- [3]. 試薬及び装置
- [4]. 操 作 法
 - 1. 標準曲線の作り方
 - 2. 実 施
 - 3. 濃縮濾紙クロマトグラフィー
 - 4. 定量法
 - 5. 灰化法
- [5]. 基礎的条件の検討
 - 1. 吸収曲線
 - 2. 標準曲線及び再現性
 - 3. コバルト錯塩Spotの安定性
 - 4. 回収試験
 - 5. 本法と分光光度計による定量法との比較
 - 6. 四塩化炭素中のコバルト錯塩の加熱濃縮による影響
- [6]. 考 察
- [7]. 結 言

II. 血液コバルト代謝の基礎的検討

- [1]. 緒 言
- [2]. 実験材料並びに実験方法
 - (A). 実験材料
 - 1. 人体実験
 - 2. 動物実験

(B). 実験方法

- 1. 血液コバルトの日内変動
- 2. 経日的変動
- 3. 各種コバルト剤の投与による血液コバルトの変動
 - (1). 投与に使用したコバルト剤
 - (2). 投与方法
- 4. 血清及び血球内コバルト値

[3]. 実験成績

- 1. 健常人の血液コバルト値
- 2. 血液コバルトの日内変動
- 3. 経日的変動
- 4. 関節リウマチ並びに2, 3疾患の血液コバルト値
- 5. 正常家兎の血液コバルト値
- 6. 各種コバルト剤投与の血液コバルト値に及ぼす影響
- 7. 血清コバルト値と血球内コバルト値との比

[4]. 小括並びに考按

[5]. 結 言

III. 温泉入浴並びに緑ばん泉飲用後に於ける血液コバルト値の変動について

- [1]. 緒 言
- [2]. 実験材料並びに実験方法
 - 1. 緑ばん泉飲用実験
 - 2. 三朝温泉入浴実験

〔3〕. 実験成績

1. 緑ばん泉飲用

2. 温泉入浴

〔4〕. 考察と結言

主要文献

I. 血液コバルトの一新定量法

〔1〕. 緒 言

近年、生体中の微量金属元素の意義が注目されつゝあり、この方面の研究には主として放射性同位元素が利用されているがこの方法は誰でもが手軽に使えるというものではない。コバルトの比色定量法としては多くの有機試薬について試みられて居り、例えば Nitroso R salt^(1), 2), 6), 11), 17), 18), Thiocyanammone^(3), 14), 17), 18), α -nitroso β -naphthol^(4), 11), β -nitroso α -naphthol^(3), 16), O-nitrosophenol⁽¹⁸⁾ O-nitrosocresol⁽⁵⁾, Rubanic acid^(9), 15), Dithizone^(7), 17), 18), O-nitrosoresorcine monomethyl ether⁽⁸⁾ などが知られている。

従来、血液、組織中のコバルトの定量には Nitroso R salt^(1), 2), O-nitrosocresol⁽⁵⁾, Dithizone^(10), 12) 等を発色試薬とする比色法の報告があるが、血液のコバルト含有量は極微量で、これ等の有機試薬による比色定量を行うには血液 50ml. ~100ml. が必要であり、血液コバルトの定量は困難であった。

鳥居⁽⁸⁾は O-nitrosoresorcine monomethyl ether による鉱泉およびニッケル地金中のコバルト比色定量法を報告しているが、著者はこの試薬が分離定量にすぐれていることに着目し、著者考案の濃縮濾紙クロマトグラフィーによる血液 5ml. を用いてのコバルト定量法を考案した。

〔2〕. 原 理

血液 5ml. を H_2SO_4 , HNO_3 , $HClO_4$ で常法通り湿性灰化し、 NH_4CH で中和後、 $Na_2S_2O_3$, Ammonium citrate 溶液を加え Cu-, Fe-イオンを遮蔽し、 Co^{++} を O-nitrosoresorcine monomethyl ether (以下 N. R. M. E. と記す) で橙黄色に発色させる。

この錯塩を CCl_4 に転溶させ、更に CCl_4 層に移った過剰の N. R. M. E. を Na_2CO_3 溶液でのぞき、 CCl_4 層を水浴上で $\frac{1}{3} \sim \frac{1}{4}$ 位まで濃縮し、著者考案の濃縮濾紙クロマトグラフィーを行い線状の Spot を Densitometer で吸光度を読み定量する。

〔3〕. 試薬および装置

〔1〕. O-nitrosoresorcine monomethyl ether 飽和溶液。

再蒸溜水 50ml. に N. R. M. E. 約 50mg. 程度を加えよく振盪しエムulsion溶液を使用する (溶解度 40. 2mg/100ml. $18^\circ C$.)

(2). Cobalt 標準溶液

石津硫酸コバルトを再結晶して得たもの 3g を $190^\circ C \sim 220^\circ C$. にて 24 時間焼いて無水塩となす。これの 0. 2630g. を硫酸 (1:3) 2ml. を含む再蒸溜水を加え溶解し 1000ml. とすると 1 ml. 中 100 γ のコバルト標準液を得る。

(3). 40% Ammonium citrate 溶液

特級 Ammonium citrate 40g. に再蒸溜水を加え 80ml. となし更に蒸溜飽和アンモニア水にて pH 8. 0 に修正し再蒸溜水にて 100 ml. とす。この溶液に Dithizone CCl_4 (0. 01%)

を加え振盪して重金属をのぞき精製する。

(4). 四塩化炭素

特級品を再蒸溜し溜出温度 77°C. のものを用う。

(5). 10%Na₂CO₃溶液

特級無水炭酸ソーダ10g. を90ml. の再蒸溜水に溶解する。

(6). アンモニア水

特級又は1級品濃アンモニア水 500 ml. に NaOH (10%) 5ml. を加え蒸溜 フラスコに入れ加温し、発生する NH₃ gas を再蒸溜水に吸収飽和させる。

(7). 過酸化水素水

市販分析用の30%のものを使用する。

(8). 再蒸溜水

硬質ガラス製蒸溜装置を使用して再蒸溜する。

(9). 硝 酸

特級硝酸を1回蒸溜する。

(10). 硫 酸

三菱化成製、精密分析用の硫酸を使用した。

(11). 過塩素酸

石津特級の過塩素酸を使用した。

(12). 20%チオ硫酸ソーダ溶液

メルク製 Na₂S₂O₃ 20g. を再蒸溜水 80ml. に溶解する。

(13). 濾 紙

東洋濾紙 No. 50 又は No. 51A, 2cm×20cm.

(14). ガラス器具

キエルダールコルベン、共通すり合せ共栓試験管、血糖用ピペット 其他。

(15). 濃縮濾紙クロマトグラフィー装置

Fig. 2. の如き装置を使用する。Paper は濾紙、Bは濾紙支持管、Sは溶媒、Aは小穴で

こゝより展開溶媒が少しづつ発散する様にしてある (内径10cm, 高さ20cm.)。

(16). Densitometer

小林式濾紙光電光度計¹³⁾ を使用した。使用フィルターは夏目製 460m μ である。

[4]. 操 作 法

(1). 標準曲線の作り方

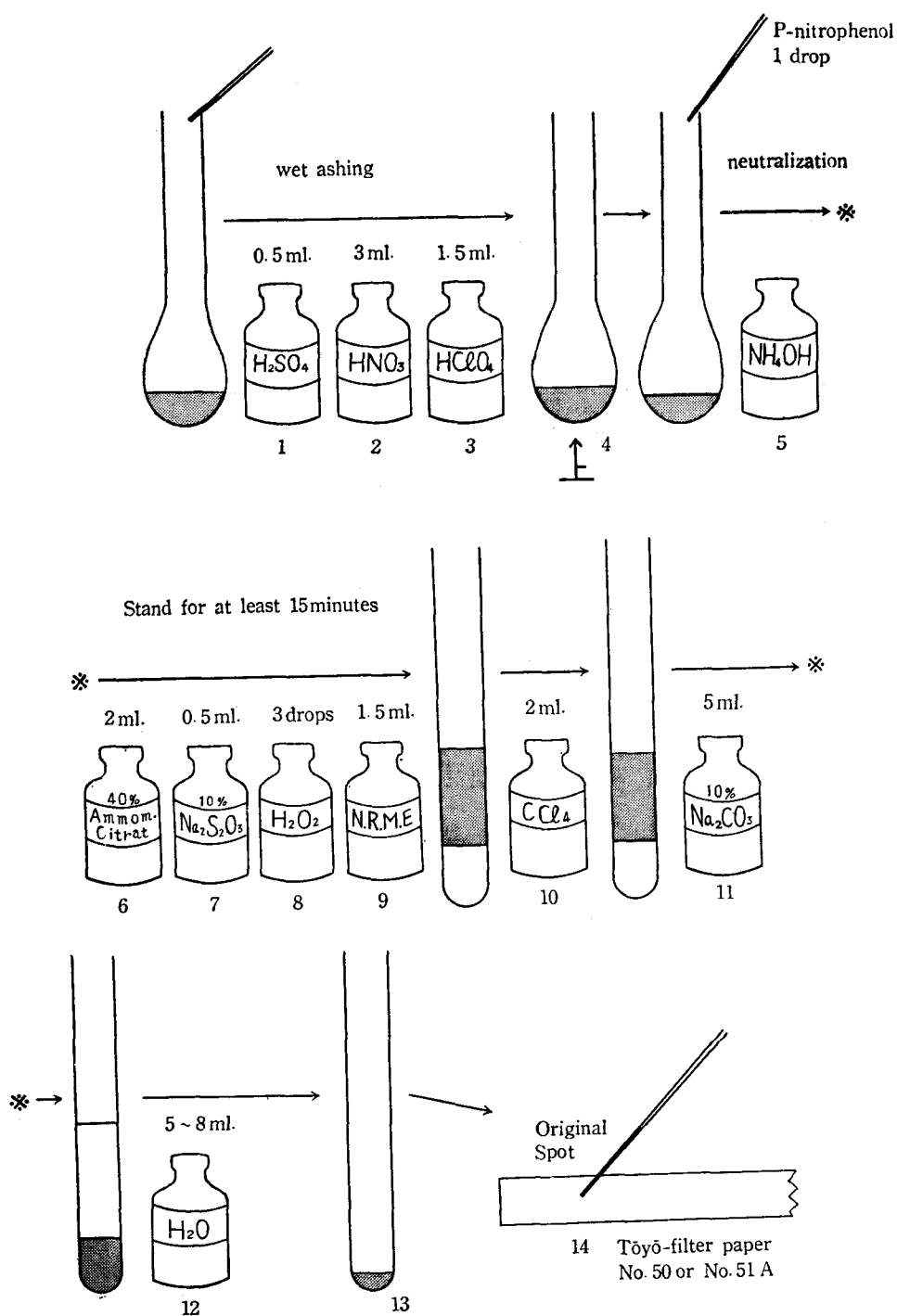
標準コバルト溶液 (100r/1 ml.) 1 ml. を 1000 ml. のメスコルベンにとり、再蒸溜水を加え目盛までみたと 0. 1r/1ml. のコバルト溶液をうる。

この溶液 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ml. 宛各々にとり再蒸溜水を加えて 100ml. とする。これ等はそれぞれ Co の 0. 3, 0. 5, 1. 0, 2. 0, 3. 0, 4. 0, 5. 0r/100 ml. に相当する。これらについて血液の場合と同様に操作して Fig. 4, 5を得た。

(2). 実 施

全血液 5ml. を内容 50ml. の Kjeldahl flask にとり、H₂SO₄ 0. 5 ml. , HNO₃ 3 ml. , HClO₄ 2ml. で湿性灰化する (湿性灰化法は 5. 灰化法でのべる)。この灰化液を Kjeldahl flask 内で P-nitrophenol を指示薬として NH₄OH で中和する。次に蒸溜 HNO₃ 1~3 滴を加え黄色を一旦無色となし、40% Ammonium citrate 溶液 3ml. を加え微黄色となす (pH 6. 5~8. 0)。次に 20% Na₂S₂O₃ 溶液 0. 5ml. , H₂O₂ 3~5 滴, N. R. M. E. 飽和液 1. 5ml. を加え15分間放置する。この溶液をすり合せ試験管にとり (液が多量の場合は内容 50ml. の分液ロートにとる) CCl₄ 2ml. を加え30秒強く振盪しコバルト錯塩を CCl₄ 層に移す。次に上層の水層を捨てる。この時、灰化後に HClO₄ が残って居れば過塩素酸ア

Fig. 1 Procedure



ンモンが析出するので更に再蒸留水を加え溶解して捨てる。溶解しない析出物はそのままにしておいても妨害にならない。 CCl_4 に移

行した過剰の N. R. M. E. を除くために 10% Na_2CO_3 5ml. を加え振盪しこれに移行させる (N. R. M. E. は強アルカリに移行し、中

性、酸性側では CCl_4 に移行する)。この Na_2CO_3 水層を捨て、一度試験管壁を再蒸留水で洗い捨てる。次に残った CCl_4 層を水浴上で加温して、0.3ml. ~ 0.5ml. 位まで濃縮する。この全 CCl_4 溶液層を濃縮濾紙クロマトグラフィーの試料とする (Fig. 1)。

(3). 濃縮濾紙クロマトグラフィー

濃縮濾紙クロマトグラフィーとは溶液の状態で錯塩を作り発色させた後、特殊な Paper chromatography を行い錯塩の色を濾紙上で線状に集め濃度を強くする方法である。即ち一種の濃縮法である。

溶液の状態で発色度がうすくて、光電比色計等の比色にかゝらない場合でもこの濃縮濾紙クロマトグラフィーで行えば定量可能である。

Fig. 2 Paper chromatography apparatus

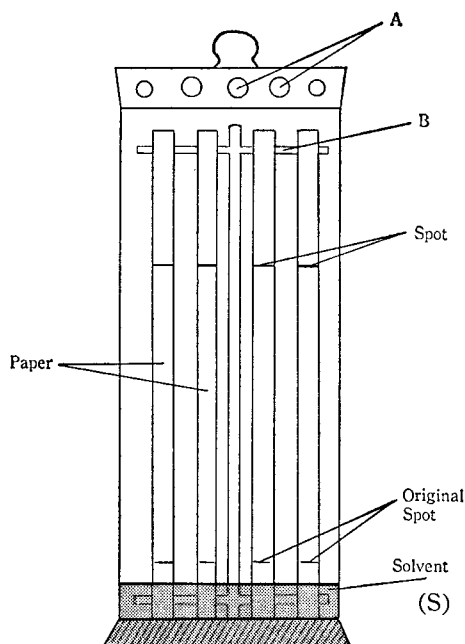


Fig. 2 のごとき装置を使用する。展開溶媒は実験の結果 90% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ でも使用出来

るが次の処方が最適である。

四塩化炭素	20ml.
90% エチルアルコール	1ml.

以上をよく振盪して白濁のエムulsion を使用し、展開の都度新調する。

濾紙は東洋濾紙 No. 50 又は No. 51A の $2 \times 40\text{cm.}$ のものを切り $2 \times 20\text{cm.}$ とする。濾紙の端より 3cm. の所を原点とし濃縮した CCl_4 の全部を血糖用ピペットで試料になるべく拡がらない様に CCl_4 を蒸発させながら少しずつ附ける。試料をつけた後約 60°C. 前後で十分乾燥し装置に入れて展開する。原点にコバルト錯塩の橙色と似た色が残る場合があるがこれは錯塩ではなく N. R. M. E. の不純物（合成後 1 ケ年内位までは使用出来るが徐々に分解されるので精製を要する）によるものでコバルト錯塩は溶媒の先端に線状になって現われてくる。原点より 8~9cm. 展開した所でやめ取出し風乾する（ CCl_4 は直ちに飛ぶが微量の水が Spot 附近に残るので完全に風乾する）。

(4). 定量法

濾紙を風乾後、 100°C. で溶融したパラフィン中に通じて濾紙を半透明にし、小林式濾紙光電光度計でフィルター $460\text{m}\mu$. を使用し 1 mm. 宛濾紙を移動し吸光度の和を求め標準グラフによりコバルトの濃度を求める。

(5). 灰化法

全血液 5 ml. を 100 ml. の Kjeldahl flask にとり、精密分析用 H_2SO_4 0.5 ml. , 再蒸溜 HNO_3 3ml. を加え最初 20 分間弱火で加温し、泡が出なくなったら、沸騰するように加熱する（急に加熱すると完全に灰化されず HNO_3 が飛ぶだけである）。 HNO_3 が飛ぶのが

終わったら直ちに HClO_4 2ml. を少しずつ加え加熱する。最初黒褐色であるが次第に透明となり灰化は終了する。しかし中和に要する NH_4OH を少なくするために HClO_4 をなるべく飛ばしてしまつて残りを H_2SO_4 だけにする。次に残った H_2SO_4 に再蒸溜水 3ml. を少しずつ注意して加え、更に2~3分間加熱しコルベン内壁に附着したコバルトを溶解し残液約 2ml. とする。

〔5〕. 基礎的條件の検討

(1). 吸収曲線

コバルト錯塩の吸収スペ

クトルを島津QR-50型光電分光光度計で測定すると Fig. 3 に示すごとく $375\text{m}\mu$. に最大吸収を有する。

(2). 標準曲線及び再現性

Fig. 4 に示す通り標準コバルト溶液の吸光度は $0.3 \sim 5.0\tau/100\text{ml}$. では直線となった。

試薬、ガラス器具等から混入したコバルトはブランクとして吸光度を差引かねばならない。ブランクの吸光度は Table 1 に示すごとくあまり変動はないが出来得れば毎回再蒸溜水をブランク用として血液の場合と同様な操作を行い吸光度を差引く。

各濃度の再現性は Table 2 に示す通りで誤差は10%以内であった。

(3). コバルト錯塩 Spot の安定性

パラフィンに浸した濾紙上の Spot は日光を遮断して保存した場合 Table 3 の如く20日間まではほとんど変化なくきわめて安定である。

Fig. 3 Absorption curve

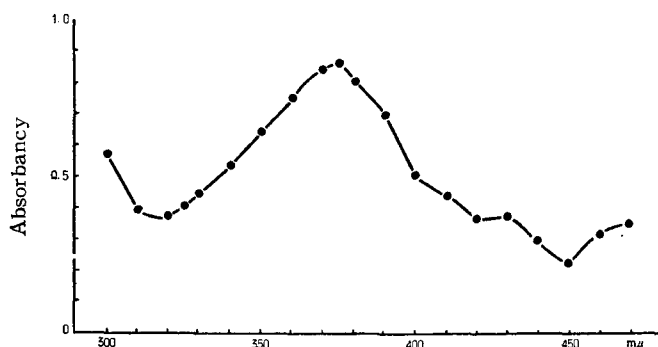
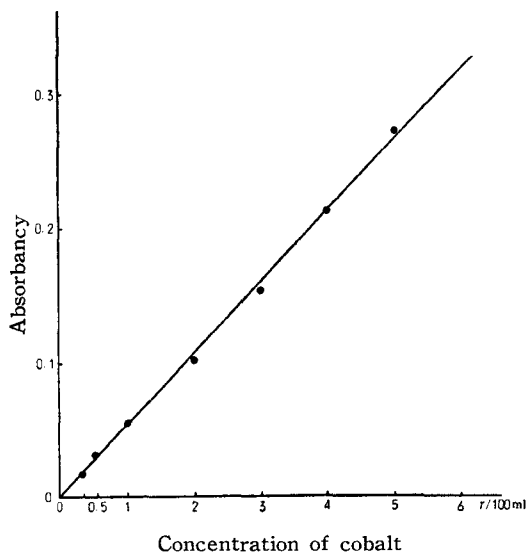


Fig. 4 Original standard curve



(4). 回収試験

血液 5ml. に $1.0, 0.5\tau/100\text{ml}$. に相当する Co^{++} を負荷し回収試験を行った所, Table 4

Table 1 Absorbance of blank.

No.	1	2	3	4	5
Absorbance	0.020	0.018	0.018	0.019	0.020

Table 2 Reproducibility of each concentration of standard cobalt solution

Applied	Measured	Reproducibility rate
0.5 r /100ml	0.5 r /100ml	100%
0.5 "	0.5 ₄ "	108 "
0.5 "	0.5 "	100 "
1.0 "	1.1 "	110 "
1.0 "	1.0 "	100 "
2.0 "	1.9 "	95 "
2.0 "	2.2 "	110 "

Table 3 Stability of spot on the filter paper.

Concentration of cobalt r /100ml	1	3	5	10	20 days
1.0	0.054	0.054	0.053	0.054	0.052
2.0	0.103	0.102	0.103	0.102	0.102
4.0	0.206	0.206	0.206	0.200	0.200

Table 4 Withdrawal-test

r /100ml				
Co	Co added	Measured	Withdrawal %	
0.4	1.0	1.4	1.0	100
0.5	1.0	1.4	0.9	90
1.0	0.5	1.5	0.5	100
1.2	1.0	2.3	1.1	110

に示す如く 90~110%であった。

(5). 本法と分光々度計による定量法との比較

保存血 70ml. を内容 300ml. の Kjeldahl flask にとり H_2SO_4 10ml., HNO_3 42ml. を加え 3 時間加熱分解する。 HNO_3 を飛ばした後 $HClO_4$ 20ml. を加え加熱を続け透明とし、なるだけ $HClO_4$ を飛ばす。次に Kjeldahl flask 中に

HN_4OH を加え中和し東洋濾紙 No. 5A で濾過し濾液をシリンダーに取り再蒸溜水を加えて 70ml. とする。この溶液 65ml. を分光々度計による定量の試料として鳥居博士⁸⁾の方法で発色させ島津 QR 50 型 400 $m\mu$. の波長で測定すると吸光度 0.004 で 0.6 r /65ml. 即ち 0.92 r /100ml. であった。

残りの 5ml. を本法の試料として測定した所、吸光度 0.048 で 0.9 r /100ml. であった。

両者の差は 3% 以内であった (Table 5).

尚、対照として血液のかわりに再蒸溜水を使用し血液の場合と同様な操作を行った。

(6). CCl_4 中のコバルト錯塩の加熱濃縮による影響

CCl_4 2ml. に抽出されたコバルト錯塩の全量を、濾紙クロマトグラフィーの試料として濾紙に吸込ませるためには、濃縮してつける方が簡単である。従ってコバルト錯塩が加熱によって吸光度に変化があるか否かを試験した。

適宜のコバルトを含む溶液にクエン酸アンモニウム、チオ硫酸ソーダ、過酸化水素水、N. R. M. E. を加え発色させ、コバルト錯塩を CCl_4 で抽出し、過剰の試薬を炭酸ソーダ

Table 5 Comparison of cobalt in blood measured by author's method and spectrophotometric method.

No. of Sample	1		2	
	Author's	Spectrophotometric	Author's	Spectrophotometric
Absorbance	0.048	0.004	0.055	0.005
Co r /100ml.	0.9	9.4	1.0	1.0

で除く。

CCl_4 層（橙色）の一部を光電比色計で吸光度を測定し、次にこの CCl_4 層を正確に15 ml. 取り水浴上で約3 ml. になるまで濃縮し、冷後 CCl_4 を加えて正確に15ml. とし更に光電比色計で吸光度を測定すると Table 6 に示す通りほとんど変化なく、水浴上での濃縮によりコバルト錯塩の分解は認められなかった。

Table 6 Effect of heating on absorbance of cobalt complex salt

No. of Sample		1	2	3
Absorbance	Before	0.238	0.077	0.042
	After	0.238	0.077	0.041

[6]. 考 察

従来、コバルトの発色試薬としては Nitroso R salt を始め数多くの有機試薬が知られている。しかしながら血液中的コバルト量は約 $1\text{r}/100\text{ml.}$ 程度であり、これらの有機試薬による比色定量は Co の絶対量 0.5r 以上でないと測定不可能であるから、とうてい生体実験の試料として通常に使用出来る血液量（5~10ml. 位）では血液コバルトの定量は不可能である。

著者は特殊な濾紙クロマトグラフィーである濃縮濾紙クロマトグラフィーを考案し血液 5ml. を使用してのコバルト定量法を案出した。

濃縮濾紙クロマトグラフィーとは溶液の状態で発色させ、この溶液の一定量を濾紙に附け R_f が 1 になる様な溶媒をえらび、展開剤が装置の上方よりわずか蒸発する様にして濾紙上での呈色を線状に集め濃度を強くする方

法である。

血液コバルト定量の発色試薬として N. R. M. E. を使用したが、この試薬は従来のものより感度、分離の点で優れている。鳥居博士は N. R. M. E. によるコバルト定量の基礎的条件の検討を行っているが定量限界は絶対量 0.5r であり、このまゝでは血液コバルトの定量に応用出来ない。

血液中の共存物質として N. R. M. E. とコバルトとの発色反応に影響をおよぼすイオン中で鉄、銅は最も重要である。N. R. M. E. は Fe^{++} では緑色、 Fe^{+++} では pH4 以下で茶褐色、 Cu^{++} では茶褐色の錯塩を生成することが知られているが鉄は

クエン酸アンモンで、銅はチオ硫酸ソーダによって遮蔽することが出来る。鳥居博士⁸⁾によれば Fe^{++} はコバルトに対し 1000 倍、 Fe^{+++} は 5000 倍の共存において 5% 以内の誤差で定量出来ると述べている。たとえ鉄、銅が十分に遮蔽されていなくてもコバルト錯塩は pH 7 に於て CCl_4 に抽出され、銅、鉄錯塩は抽出されない点で分離することが出来る。

誤差の問題であるが、濾紙光電光度計の機械的誤差が大きく改良が望ましいと考える。湿性灰化に H_2SO_4 , HNO_3 , HClO_4 を使用したが、これらの試薬にはコバルトが含まれているおそれがあるので HNO_3 は蒸溜し、 H_2SO_4 , HClO_4 は出来るだけ少く使用する様にした。特に H_2SO_4 は灰化後に中和に要する NH_4OH を少くするため、0.5ml. とした。誌薬中のコバルト含有量は NH_4OH が最高であったので必ず再蒸溜する必要がある。灰化がうまく行くか否かによって誤差が

大きくなるので十分注意すべきである。

濾紙上に附いている微量のコバルトが発色し誤差を大きくするおそれがあるので、あらかじめ CCl_4 から過剰の N. R. M. E. を Na_2CO_3 で除去した。

試薬を調製する毎に検量曲線を作つてみる必要があるのは一般光電比色定量的場合と同様である。

吸収スペクトルは Fig. 3 に示す如く $375\text{m}\mu$ に最高の吸収を有するのでフィルターは $420\text{m}\mu$ 附近を使用した方がよいが著者は手に入らなかったので $460\text{m}\mu$ を用いた。

以上の如く注意しても尚 $\pm 10\%$ の誤差があるが、臨床的検査には十分利用出来ると思はれる。

本法による血液コバルト定量法の注意を次に記す。

(1). N. R. M. E. は合成後 1 年以内のもので精製されたものを使用する (東京化成の G. R. 分析表付のものを使用すればよい)。
N. R. M. E. 飽和溶液は常温で 3~4 日で分解

するので冷蔵庫内に貯蔵し 1 週間毎に新調した方がよい。

(2). 展開溶媒は毎回新調し、展開距離は常に一定にする。

(3). 錯塩生成時の pH は 6.5~8.0 内であること。

(4). Fe^{+++} が多い場合は Ammonium citrate 溶液及び H_2O_2 の添加量を増せばよい。

[7]. 結 言

以上の検討により、本法は次のごとき特徴があり血液コバルトの定量法として既知のいづれよりも優れた性能を有するものと考えられる。

(1). 従来の血液コバルト定量法は血液 50 ml. ~100ml. を必要としたのに比し、本法は 5ml. で定量出来る。

(2). 本法は操作が比較的簡単でコバルト代謝の研究に応用出来る。

(3). 血液中の鉄、銅の分離操作を行うことなく定量可能である。

II. 血液コバルト代謝の基礎的検討

[1]. 緒 言

ヒト並びに動物体内の各種代謝に関する微量金属元素の医学的意義は、近來頗る注目せられるに至った。特に鉄、銅、亜鉛、Cobalt 等は造血機能に関係ある金属元素として、就中、鉄、銅に関しては夥しい業績が発表せられており、著者¹⁹⁾もさきに血清鉄の一新定量法を考案し、該法は日常の臨床検査に充分応用出来ることを報告した。

血液 Cobalt に関しては Waltner and Waltner (1929)²⁰⁾ が Cobalt を長期間正常

動物 (Rat) に投与すると赤血球增多症を惹起しうることを発表して以来、この事実は多数の研究者によって確認せられたが、その機転に関して Cobalt は SH-基、或いは Enol 化しうる CO-基と結合して作用し、還元酵素系を遮断して組織に酸素欠乏状態をきたし、これが刺激となって血色素合成の速度をはやめ、貯蔵鉄の動員が行われるという学者もあり^{21), 22)}、又、Cobalt は銅と同じように鉄が Heme を合成する時に触媒的に働いてこれを促進させる作用があるといわれてい

るが²³⁾、現在迄のところ充分解明されるに至っていない。

他方 New Zealand, Australia, Florida その他の地方に反芻動物の風土病として知られ、Coast disease, salt-sick 等の名で呼ばれている貧血症は、現今では飼料中の Cobalt 不足によるものと考えられる。²⁴⁾ Cobalt は Vitamine B₁₂ 中には4%の濃度に結合してその1構成元素をなしているが、Cobalt 不足のためこれ等動物の前胃中の Vitamine B₁₂ の合成が阻害されるからだという²⁵⁾。

又、Cobalt そのものの増血作用に関して動物実験、臨床報告がある^{26), 27), 28)}

何れにしても、Cobalt が赤血球生成に或る条件下で非特異的的刺激として作用することは明らかであるところである²⁵⁾。

扱て 血液中の Cobalt は極めて微量であるため、^{1), 11), 29)} 現在迄に発表せられた方法を用い、日常の臨床実験に供しう程度の少量の血液では到底その測定は不可能であった。第1章に述べた血液-Cobalt の測定法は臨床検査に充分利用し得ることを認めたので、著者は健常人、健常白色家兎の血液Cobalt 値、及びその生理的変動、血清 Cobalt 値と血球内 Cobalt 値との比、2~3 の内科的疾患の血液 Cobalt 値をしらべ、各種 Cobalt 剤の吸収試験を行った。

〔2〕. 実験材料並びに実験方法

(A). 実験材料

(1). 人体実験

ヒトでは研究所職員、当研究所入院並びに外来患者を被験者とした。

女子では月経期及び月経終了直後を避けて採血した。

(2). 動物実験

原則として、体重2.0~3.5kgの健康成熟雄性白色家兎を使用した。飼料は豆腐粕約350g~400g/1日を投与した。

(B). 実験方法

(1). 血液 Cobalt の日内変動

健常人5名について平常通り食事を行わせ午前10時、午後1時、午後5時に肘静脈より採血し、測定に供した。

(2). 経日的変動

1~5日にわたって研究所職員男女7名について、原則として午前10時に採血して経日的変動をしらべた。

(3). 各種 Cobalt 剤の投与

1. 投与に使用した Cobalt 剤

各種 Cobalt 剤を投与し、Cobalt の吸収試験を行った。投与に使用した Cobalt は次に示す通りであった。

(A). 人体実験

- (a). Cobalt gluconate (エーザイ)
0.1g. (Co:12mg)
Vitamine C 散 1.0g.
(V. C.:50mg)
- (b). Cobalt gluconate 0.05g
(Co:6mg)
Vitamine C 散 0.5g (V. C.:25mg)
- (c). チョコラB鉄錠 16Tab.
(Co:5.76mg)

(B). 家兎実験

Cobalt として100 γ /ml.の溶液を得るよう
に Cobalt gluconate を再蒸溜水に溶解して
これを Cobalt gluconate一液とした。

- (a). Cobalt gluconate一液 6ml.
(Co:600 γ)
- (b). Cobalt gluconate一液 6ml.
Vitamine C 10mg.

(c). Cobalt sulfate—液 6ml.
(Co:600r)

2. 投与方法

(A). 人体実験

ヒトでは前記の (a), (b), (c) の Cobalt 剤を投与し血液 Cobalt 値の変化をしらべた。即ち, (a) の Cobalt gluconate 0.1g. 投与では健常人 5 名に食後, 又は午前10時の食間に服用させ, 前, 1時間, 3時間, 6時間 にわたり採血し Cobalt 値を測定した。

(b) の Cobalt gluconate 0.05g. 投与では健常人 4 名に食後に投与し, 前, 1時間, 3時間, 6時間にわたり採血し測定に供した。

(c) のチョコラ B—Fe 錠は健常人 5 名に16錠を 1 回に食後服用させ, 前及び 3 時間後に採血し測定に供した。

(B) 家兎実験

家兎実験では豆腐粕投与30分～1時間後にカテーテルにて投与し, 前及び 3 時間後心臓穿刺により採血し測定に供した。Vitamine C 同時投与群では投与直前に Vitamine C を溶液に加えて溶解後服用せしめた。

(4). 血清及び血球内 Cobalt 値の測定

heparin 添加で凝固を防止した血液又は保存血を10ml. 乃至 20ml. 正確に取り大きな遠沈管に入れ3000回転で20分間遠心し, 血清を灰化コルベンに移し, 残余の血球層に再蒸溜水で調製した0.9% NaCl 5ml. をくわえ静かに洗い再び遠沈し上清を上述灰化コルベン中の血清に加えた。同様操作による洗滌を 3 回行い洗液はすべて上述の血清に加えた。残った血球に再蒸溜水を加えて他の灰化コルベン

Table 7 Cobalt in the blood of healthy subjects.

No.	Name	Sex	Age	Cor/100ml	No.	Name	Sex	Age	Cor/100ml
1	A. Y.	♂	23	3.3	1	K. M.	♀	20	0.2
2	M. I.	"	30	1.2	2	H. K.	"	24	0.5
3	T. Y.	"	24	1.6	3	T. M.	"	26	0.4
4	H. A.	"	29	3.6	4	S. M.	"	22	0.6
5	M. I.	"	24	1.8	5	A. I.	"	22	0.2
6	T. N.	"	33	1.0	6	T. N.	"	20	1.0
7	Y. Y.	"	31	0.4	7	T. Y.	"	21	1.0
8	K. A.	"	36	1.2	8	S. T.	"	22	1.3
9	E. M.	"	21	2.0	9	H. N.	"	24	2.2
10	T. H.	"	21	0.9	10	S. T.	"	29	1.9
11	M. I.	"	31	1.6	11	M. K.	"	22	0.6
12	T. I.	"	30	0.5	12	M. T.	"	25	0.2
13	N. M.	"	41	1.5	13	K. N.	"	18	0.5
14	K. M.	"	31	2.2	14	S. O.	"	25	0.8
15	M. S.	"	38	2.6	15	I. T.	"	20	0.2
16	U. M.	"	48	0.9	16	M. K.	"	28	0.5
17	W. M.	"	57	1.8	17	N. Y.	"	23	0.4
18	T. H.	"	27	1.3	18	S. I.	"	23	0.7
19	T. K.	"	41	1.4	19	T. T.	"	24	0.4
20	S. I.	"	18	0.8	20	K. T.	"	22	1.0
Average				1.6 ±0.4	Average				0.7 ±0.3

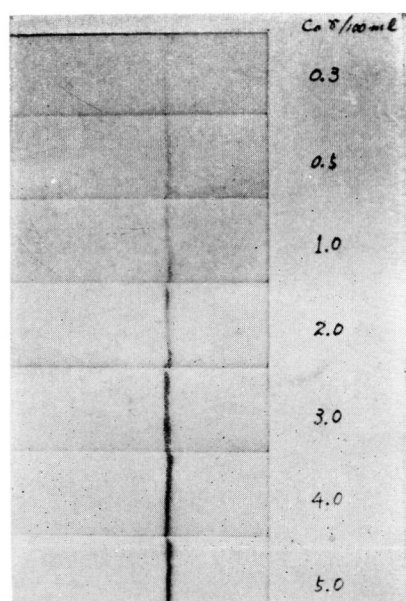
中に洗い出し、かくして血清と血球内の各々の Cobalt 値を測定した。

〔3〕. 実験成績

(1). 健常人の血液コバルト値

研究所職員男子20例、女子20例、合計40例の血液 Cobalt 測定値は Table 7 及び Fig. 6, 7 に示したごとく男子0.4~3.6 γ /100ml. でその平均値は $1.6 \pm 0.4\gamma/100\text{ml.}$ (95%の信頼限界) であり、女子では0.2~2.2 γ /100ml. で平均値 $0.7 \pm 0.3\gamma/100\text{ml.}$ (95%の信頼限界) であった。両者には1%

Fig 5 Paper chromatograms of standard cobalt solution



の危険率で有意性を認めた。

(2). 血液 Cobalt の日内変動

Table 8, Fig. 8 に示すごとく5例の平均値ではいちじるしい変動を示さなかった。

即ち、平均値で10 a. m. では1.05, 1p. m. では1.1, 5p. m. では1.05 γ /100ml. であった。

Fig 6 Cobalt in the blood of normal subject and rheumatoid arthritis

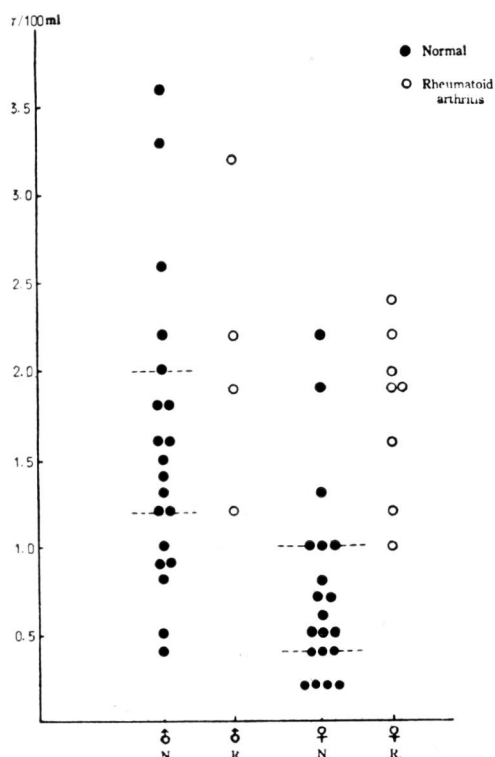


Fig 7 Paper chromatograms of cobalt in normal human blood

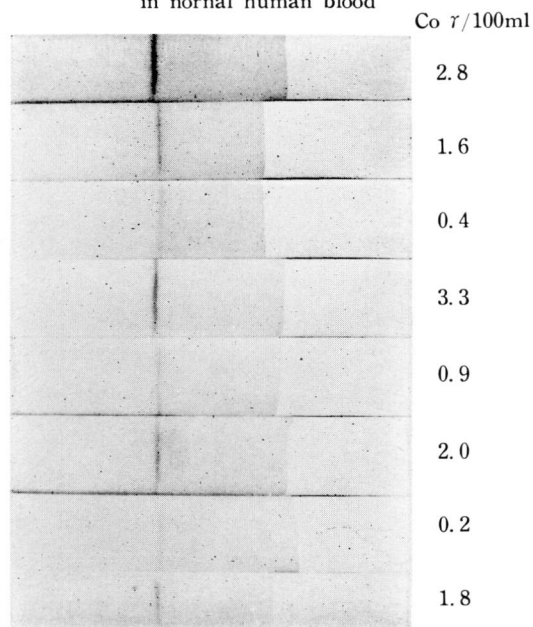


Table 8 Diurnal variation in the blood cobalt levels.

Name	Sex	Age	10a.m.	1p.m.	5p.m.
K. A.	♂	36	1.0	1.1	1.2
A. I.	♀	22	0.3	0.2	0.2
S. T.	♀	29	1.6	1.8	1.4
M. I.	♂	30	1.3	1.3	1.4
Average			1.05	1.1	1.05

Fig. 8 Diurnal variation in the blood cobalt levels

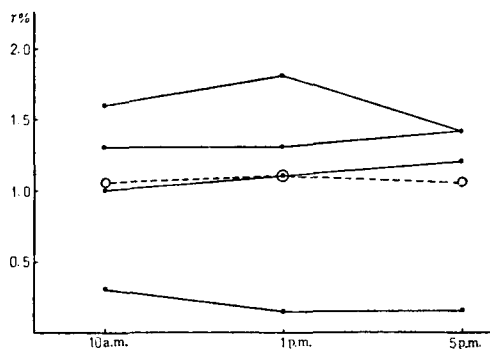


Table 9 Daily variation in the blood cobalt levels.

Name	Sex	Age	1	2	3	4	5 Days
M. I.	♂	30	1.2	1.2		1.0	0.9
K. A.	♂	36	1.0			1.1	
A. I.	♀	22	0.3			0.2	
S. T.	♀	29	1.9		1.6		1.8
H. N.	♀	24	2.2	2.0		2.0	
T. Y.	♀	21	1.0		0.8		
A. Y.	♂	23	2.6		2.8		
Average			1.33	1.6	1.73	1.07	1.35

(4). 関節リウマチ並び

に 2, 3 疾患の血液

Cobalt 値

各種血液疾患や肝臓疾患に於ける血清鉄の検索はその病態生理解明の上に重要な位置を占めていることは周知のところである。緒言

Fig. 9 Daily variation in the blood cobalt levels

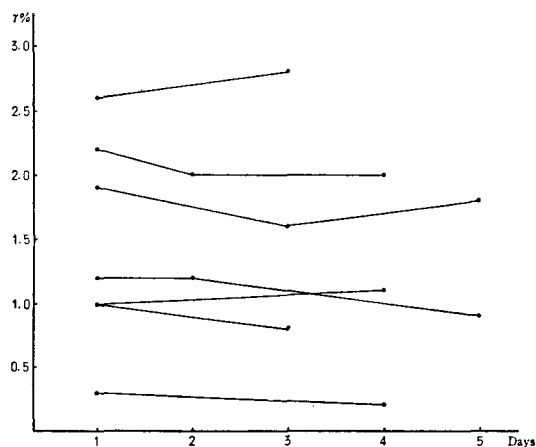


Table 10 Cobalt in the blood of rheumatoid arthritis.

Name	Sex	Co r/100ml.
Nishimoto	♀	2.0
Omori	♀	1.9
Fujimoto	♀	1.6
Ogahara	♀	1.9
Fukui	♀	2.2
Matsumoto	♀	1.2
Imada	♀	1.0
Hamada	♀	2.4
Hirano	♂	2.2
Yokura	♀	1.9
Huruzawa	♀	3.2
Katayama	♀	1.2

(3). 経日的変動 (日差)

1~5日間にわたる経日的変動は Table 9 及び Fig. 9 に示したごとく、個体差が著しかったが、各例の変動は最大 0.3r/100ml. 最少 0.1r/100ml. であった

にも述べた如く生体内微量元素である Cobalt が造血機転に関与しているとすれば、各種貧血症の場合、血液 Cobalt 値に変動を来すであろうことは容易に想定せられるとこ

Table 11 Comparison of blood cobalt levels, erythrocytes, hemoglobin and serum iron levels.

Name	Sex	Disease	Co r%	Hb %	Erythrocytes ×10 ⁴	Serum Fe r%
Yata	♀	Liver cirrhosis	0.4	65	258	
Yamamoto	♀	Anemia	0.2	61	351	
Yoshida	♀	Hemolytic anemia	0.2	70	446	
Yoshida	♂	Liver cancer	0.5			
Nōmi	♀	Anemia	0.2	56	449	
Sasaki	♀	Anemia	1.0	71	413	
Suyama	♂	Anemia	2.4	70	397	
Koyama	♂	Cancer of the stomach	0.15	48	307	32
Odaka	♂	Hypoplastic anemia	0.2			47
Hasegawa	♀	Leukemia	0.1			33
Miyamoto	♂	High blood pressure	0.9			68

ろである。著者はリウマチ貧血患者を主として2～3内科的疾患々者の血液 Cobalt 値を測定した。関節リウマチ患者12例（男4例，女8例）の血液 Cobalt 値は Table 10, Fig. 6の如くであった。即ち男子では1.2～3.2r/100ml. 平均2.1r/100ml., 女子では1.0～2.4r/100ml. 平均1.78r/100ml. で何れも健常人より高値を示し，女子に於ては健常人との間に有意差（危険率1%）を証明出来た。低色素性貧血の症例では低値を示す症例が多かった。溶血性貧血，肝硬変，肝癌，胃癌，再生不良性貧血，白血病の各1例では何れも低値であった（Table 11）。

(5). 健常家兎の血液 Cobalt 値
雄性健常家兎19例の血液 Cobalt の測定値は Table 12 に示したごとくで0.5～3.3r/100ml. 平均値1.92±0.32r/100ml. (95%信頼限界)であった。

Table 12 Blood cobalt levels in healthy male rabbits.

Rabbit No.	Co r%	Rabbit No.	Co r%
1	2.4	11	2.3
2	0.75	12	2.0
3	0.9	13	2.0
4	2.0	14	1.5
5	3.3	15	1.8
6	0.5	16	2.3
7	3.0	17	1.4
8	2.8	18	1.8
9	1.7	19	1.6
10	2.5	Average 1.92±0.32	

Table 13 Comparison of blood cobalt levels, erythrocytes, hemoglobin, leucocytes and serum iron levels.

Rabbit No.	Erythrocytes ×10 ⁴	Hb%	Leucocytes	Serum Fe r%	Blood Co r%
1	465	75	4650	182	2.3
2	492	76	10200	214	2.0
3	532	88	6600	160	2.0
4	547	90	7850	220	1.5
5	534	82	7700	225	1.8
6	576	90	8950	216	2.3
7	435	80	6600	176	1.4
8	504	82	8650	148	1.8
9	428	86	11900	185	1.6
Average	501	83	8122	191	1.85

尚, 正常家兎9例について赤血球数, 血色素, 白血球数, 血清鉄と血液 Cobalt を測定したが一定の関係は見出し得なかった (Table 13).

(6). 各種 Cobalt 剤投与の血液 Cobalt 値に及ぼす影響

(A). 人体実験

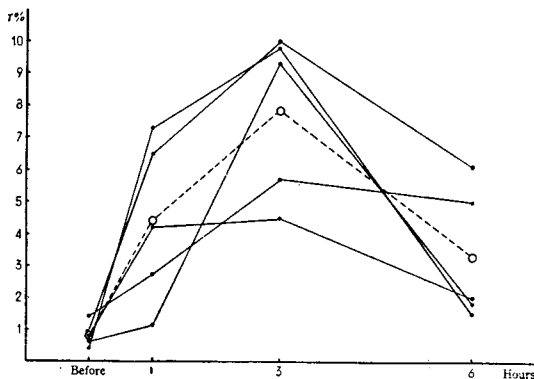
(a). Cobalt gluconate と Vitamine C の同時投与による血液 Cobalt 値の変化

Table 14 及び Fig. 10 に示したやうに Cobalt gluconate (Co^{++} として12mg) 食後30分服用では5例の平均値でみると前0.82,

Table 14 Blood cobalt levels before and after medication of cobalt-gluconate with Vitamine C (after a meal) (Co^{++} :12mg, V.C 50mg)

Name	Sex	Age	Before	1	3	6 Hours
M. K.	♀	28	0.4	7.3	9.8	1.5
S. O.	〃	25	0.9	6.5	10.0	6.1
M. K.	〃	22	0.6	1.1	9.2	1.8
T. Y.	♂	24	1.4	2.7	5.7	5.0
S. Y.	♀	20	0.8	4.2	4.5	2.0
Average			0.82	4.36	7.86	3.28

Fig. 10 Blood cobalt levels before and after medication of cobalt-gluconate with Vitamine C (after a meal) (Co^{++} :12mg, V.C 50mg)



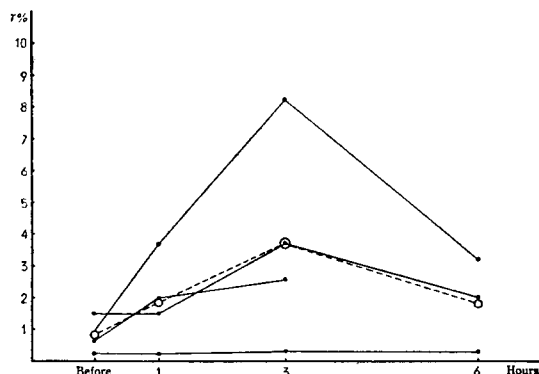
1時間4.36, 3時間7.86, 6時間3.28 γ /100ml. であった。即ち, 1時間でやゝ高値を示し, 3時間で最高値になり6時間で前値に復する傾向を示した。

空腹時の午前10時服用では4例の平均値でみると前0.85 γ /100ml., 1時間で1.85, 3時間3.7, 6時間で1.83 γ /100ml. であった。即ち, 3時間で最高値を示したが, 食後30分服用の場合に比べ血液 Cobalt 値の上昇は低かった (Table 15, Fig. 11).

Table 15 Blood cobalt levels before and after medication of cobalt-gluconate with Vitamine C (between two meals) (Co^{++} :12mg, V.C 50mg)

Name	Sex	Age	Before	1	3	6 Hours
S. Y.	♀	20	0.7	2.0	2.6	
T. Y.	♂	24	1.5	1.5	3.7	2.0
M. I.	♂	30	1.0	3.7	8.2	3.2
T. I.	♀	24	0.2	0.2	0.3	0.3
Average			0.85	1.85	3.7	1.83

Fig. 11 Blood cobalt levels before and after medication of cobalt-gluconate with Vitamine C (between two meals) (Co^{++} :12mg, V. C 50mg)



100ml. で Co^{++} 12mg 食後服用の場合の濃度のほぼ半量の値を示した。

(b). Chocola B-Fe錠投与による血液 Cobalt 値の変化

Chocola B-Fe 錠は1錠中にグルコン酸鉄 60mg, グルコン酸 コバルト 3mg, 硫酸銅 0.5mg, Vitamine B₁, B₂ 各 0.5mg, Vitamine B₁₂ 0.5γ, 葉酸 0.1mg, ニコチン酸アミド 2.5mg. を含有する糖衣錠である。

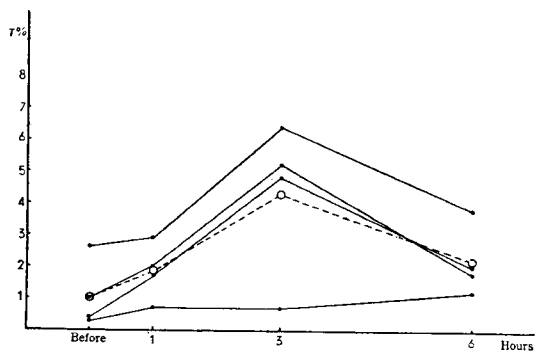
Table 16 Blood cobalt levels before and after medication of cobalt gluconate with Vitamine C (after a meal) (Co^{++} :9mg, V. C 25mg)

Name	Sex	Age	Before	1	3	6 Hours
K. A.	♂	36	1.0	2.0	5.2	1.8
T. H.	♀	18	0.4	1.7	4.8	2.0
A. Y.	♂	23	2.6	2.9	6.4	3.8
A. I.	♀	22	0.3	0.7	0.7	1.2
Average			1.0	1.82	4.27	2.2

Cobalt gluconate (Co^{++} として6mg) 食後30分服用では Table 16及び Fig. 12に示したごとく, 健常人4例の平均値でみると前1.0, 1時間1.82, 3時間4.27, 6時間2.2γ/

Chocola B-Fe 錠16錠 (Co^{++} として5.76 mg.) を食後30分に頓服した場合の血液コバルト値は Table 17, Fig. 13に示したごとくで, 平均値において前1.14, 3時間で4.6γ/100ml であった。即ち Cobalt gluconate

Fig. 12 Blood cobalt levels before and after medication of cobalt gluconate with Vitamin C (after a meal) (Co^{++} :6mg, V. C 25mg)



0.05g. (Co^{++} として6mg.) 食後投与の場合とはほぼ同様の値を示した。

(B). 家兎実験

家兎における Cobalt 吸収試験は Table 18 及び Fig. 14に示したごとく, Cobalt gluconate 単独の場合が最高吸収を示し, Cobalt gluconate+ Vitamine C, 硫酸コバルトの順で特に硫酸コバルト投与の場合は血液 Cobalt 値は低値であった。

Table 17 Blood cobalt levels before and after medication of Chocola B-Fe tablet (after a meal) (Co^{++} :5.76mg)

Name	Sex	Age	Before	3 Hours
S. Y.	♀	20	0.6	3.1
T. Y.	♂	24	1.5	5.5
K. A.	♂	36	0.8	3.8
A. Y.	♂	23	2.4	7.7
A. I.	♀	22	0.4	2.9
Average			1.14	4.6

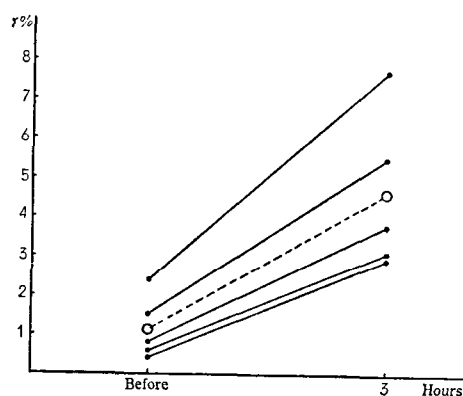
 Fig. 13 Blood cobalt levels before and after medication of Chocola B-Fe tablets (after a meal) (Co^{++} :5.76mg)


Fig. 14 Blood cobalt levels before and after medication of cobalt compounds in healthy rabbits.

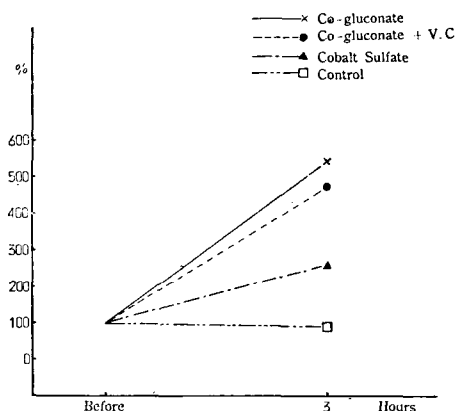


Table 18 Blood cobalt levels before and after medication of cobalt compounds in healthy rabbits.

Rabbit No.	Before	3 Hours	
1	2.4	3.3	Co-gluconate
2	0.75	11.4	
3	0.9	7.4	
Average	1.35	7.36	
4	2.0	15.9	{ Co-gluconate V.C
5	3.3	6.8	
6	0.5	4.4	
Average	1.9	9.0	
7	3.0	10.2	Cobalt Sulfate
8	2.8	7.6	
Average	2.9	8.9	
9	1.7	1.7	Control
10	2.5	2.3	
Average	2.1	2.0	

(7). 血清 Cobalt 値と血球内 Cobalt 値の比

Table 19に示したごとく、平均値で見ると血清 Cobalt 値 $0.71\gamma/100\text{ml.}$ 、血球 Cobalt 値は $0.9\gamma/100\text{ml.}$ で、その比は $1:1.27$ となり血球内 Cobalt 値が大であった。

〔4〕. 小括並びに考按

著者は血液 Cobalt 代謝の基礎的検討を行った。その成績を小括すると

1). 血液 Cobalt の日内変動は健康人において10a. m. から5p. m. までの間はほとんど認められなかった。

2). 経日的変動は1~5日の間では認

Table 19 Comparison of the serum cobalt level and erythrocyte cobalt.

No.	Blood	Blood Co r%	Serum cobalt r%	Cobalt contained in erythrocytes r%
I	5ml	1.9		
	20ml		0.8	1.0
	20ml		0.85	1.1
II	5ml	1.2		
	20ml		0.5	0.6
Average		1.55	0.71	0.9

むべきものがなかった。

3). 健常人の血液 Cobalt は一般に男性は高値を示し、女性は低値で両者の間に有意の差を認めた。リウマチ患者では健常人にくらべ高値を示した。

4). 健常家兎の血液 Cobalt 値は個体差が大であるが平均値においてはヒトの血液 Cobalt 値より高値であった。赤血球数、血色素量、白血球数、血清鉄量等と血液 Cobalt 値との間には一定の関係は見出し得なかった。

5). ヒト及び家兎実験の結果 Cobalt gluconate の吸収は食間投与より食後投与の方がよく、Vitamine C 併用との差はみられなかった。又、硫酸コバルトは Cobalt gluconate より劣っていた。

Cobalt gluconate 並びにグルコン酸鉄、其他、硫酸銅、Vitamine B 群が含有されている Chocla B-Fe 錠服用でも Cobalt gluconate 投与の場合とはほぼ同様で差を認めなかった。

6). 血清 Cobalt 値と血球内 Cobalt 値との比は1:1.27であった。

造血機能、特に赤血球の生成に関して、生体内にきわめて微量に存在する鉄、銅、

Cobalt などの重金属が重要な役割を演じておるといわれ、鉄並びに銅に関しては広く検索されているが、Cobalt についてはまだ充分な知見が得られていない。

生体中の Cobalt は肝臓に最も多く、次いで心、肺、腎、骨、で、血液の Cobalt 含有量は極微量であるため、^{1), 29), 30), 31)} 通常使用し得る少量の血液では Cobalt の定量は困難であった。従って血液 Cobalt 値乃至血清 Cobalt 値の測定値についての報告も少く、Wolff¹¹⁾ の発光分光分析による健常人8例の血清 Cobalt 値は0.17~1.48r%であり、又赤血球の Cobalt 値は $1.2 \pm 0.32r\%$ であるという³²⁾。Yoritaka T. は2例の血液 Cobalt 値は3.4及び3.6r/100ml であったと報告している¹⁾。

著者の検索によると、男性20例、女性20例合計40例の血液 Cobalt 値測定成績では男性0.4~3.6r/100ml. 平均 $1.6 \pm 0.4r/100ml.$ で女性では0.2~2.2r/100ml. 平均 $0.7 \pm 0.3r/100ml.$ で両者の間に危険率1%で有意の差を認めた。又、血清Cobalt値より血球Cobalt値が大でその比は1:1.27であった。即ち大量試料による従来報告とはほぼ同様な値を得た。

雄性白色家兎の血液 Cobalt 値についての

報告はみられないが著者の測定では $0.5 \sim 3.3$ $r/100ml$. 平均 $1.92 \pm 0.32 r/100ml$. で健常人の場合よりその濃度は大であった。

Cobalt は赤血球生成に強い刺激的作用があると Heilmeyer 等²⁸⁾ はのべ、又、山本等²⁷⁾ は正常家兎に対する作用は $0.05mg./kg.$ では現われず、 $0.5mg./kg.$ では極めて軽度、 $5mg./kg.$ に至って初期の一過性増多並びに網赤血球増加に先駆される真の増血が完全に現われるとのべ、又、Wolff²¹⁾、河方³³⁾、堀田³⁴⁾、高杉³⁵⁾ 等も鉄と Cobalt を併用すれば特に血清鉄の回復が著明に短縮強化されるので貧血の回復に極めて有利であると報告している。

又、Cobalt は体内の貯蔵鉄を動員して造血臓器に運びこみ、且つ骨髓の造血機序において血色素合成に触媒的に働くものといわれているが^{21), 23)} 未だ Cobalt の作用機序についての詳細は不明の点が多い様である。

近年、放射性 Cobalt を使用しての Cobalt の生体内代謝の研究によると Co^{60} を試験管内で人血清に添加し濾紙電気泳動のほか、Radioautography 及び放射能測定の結果 Co^{60} は Albumin 分画に結合して(多発性骨髄腫患者血清では β 及び γ -globulin 間に Co^{60} を認めた) いることを認め、又二十日ネズミに Co^{60} を皮下注射或は経口投与した場合 Co^{60} は血清 Albumin, α -及び β -globulin 分画に認められたと報告している³⁶⁾。

菊地等³⁷⁾ は Co^{60} は経口的に又は非経口的投与により大部分は糞便とか尿中に排出し体内には肝、臓、脾、腎 等に多く集ると述べ、又 Comar 等³¹⁾ も同様な結果を得ている。

著者実験の Cobalt gluconate (Co^{++} とし

て $12mg$) 投与で全量の Cobalt が吸収され平等に血液中に分布したとすれば、ヒトの体重 $60kg$ の場合 $260 r/100ml$. に増加するはずであるが、実際には血液へ現われる濃度は $7.86 r/100ml$. で投与量の $1/34$ に過ぎない、即ち、Cobalt 投与量の約 2.7% が吸収されたこととなる。

〔5〕. 結 言

血液 Cobalt 代謝の検討を行い次の結果を得た。

1). 血液 Cobalt 値の日内変動を認めなかった。

2). 経日的変動も $1 \sim 5$ 日間では認められなかった。

3). 健常人の血液 Cobalt 値は男性 20 例では $1.6 \pm 0.4 r/100ml$, 女性 20 例では $0.7 \pm 0.3 r/100ml$, 両者の間に危険率 1% で有意の差を認めた。

4). 雄性白色家兎 19 例の血液 Cobalt 値は $1.92 \pm 0.32 r/100ml$. であった。又、赤血球数、血色素量、白血球数、血清鉄等と血液 Cobalt 値の間には一定の関係は見出し得なかった。

5). 各種 Cobalt 剤の吸収試験を行い次の事を知り得た。

(a). Cobalt gluconate の吸収は食間投与より食後 30 分投与の方が大であった。

(b). Cobalt gluconate と Vitamine C の併用投与と Cobalt gluconate 単独投与との間に差は見出し得なかった。

(c). 硫酸コバルトの投与による血液 Cobalt 値は Cobalt gluconate の場合より低かった。

(d). Cobalt gluconate の外グルコン酸

鉄、硫酸銅、Vitamin B 群を含有するという Chocola B-Fe 糖衣錠服用でも Cobalt gluconate 投与の場合とほぼ同様の吸収成績を示した。

6). リウマチ患者の血液 Cobalt 値は男子 2.1 γ /100ml., 女子 1.78 γ /100ml. で健常人より高かった。

Ⅲ. 温泉入浴並びに緑ばん泉飲用後に於ける血液 Cobalt 値の変動について

〔1〕. 緒 言

近年、温泉化学方面より温泉の微量成分の研究が盛んとなり、本邦に於ても木村健二郎教授門下によって多数の温泉の微量成分が測定せられるに至った。微量成分の中、Cobalt に関しては Mazade, M., Fresenius, R., Bardet, J., Forjaz, A. P. 等により温泉中にその存在が確認せられ³⁸⁾、又、Miholic, S. S., Nasini, R. 等は Ronneby 鉱泉、Roncigno 鉱泉中に夫々 2.649mg./kg., 2.313mg./kg. の Cobalt を検出している³⁹⁾。

木村教授等⁴⁰⁾は別府温泉、箱根湯花沢温泉、村杉温泉、金鶏鉱泉等に、川上等は別府温泉⁴¹⁾、雲仙温泉⁴²⁾に Cobalt の存在を認めているが、最近鳥居はその提案になる O-nitrosoresorcine monomethyl ether を用いる比色定量法で本邦の 50 鉱泉につき検索し、その 21 泉に Cobalt を検出証明し、最高は天徳鉱泉の 4.40mg./l. であったという³⁸⁾。鉄泉殊に緑ばん泉飲用が貧血症に有効なことは周知³⁹⁾で吾が国でも小谷⁴³⁾のつとに証明したところであるが、外園⁴⁴⁾は中国地方にある藤野、三石、柵原鉱泉の飲用で著明な増血効果を得たのはその含有する Cobalt, Manganese, Copper の如き造血因子が鉄と協力的に作用したことによるのであらうと述べている。

Cobalt は Mn, Zn, Cu と共に無機性

ビタミンと呼ばれているが貧血症に於ける Cobalt の医学的意義については第 2 章で概述したところである。

著者は柵原鉱泉飲用後の血液 Cobalt 値の変動を追求し、併せて放射能泉たる三朝温泉入浴の血液 Cobalt 値に及ぼす影響について検索したのでその結果を報告する。

〔2〕. 実験材料並びに実験方法

(1). 緑ばん泉飲用実験

実験に使用した緑ばん泉は柵原鉱泉水で、採取後数ヶ月を経たものである。 $Fe^{++} + Fe^{+++}$ は 2.5g/l. で、鳥居氏法にて測定したコバルト濃度は 100 γ /l. であった。その分析表は第 1 報に記載した¹⁹⁾。

被験者は当研究所健康職員女子 3 名、男子 1 名計 4 名である。緑ばん泉 30ml. に水道水を加え 200ml とし、空腹時に頓用させ、服用前、及び 1, 3, 6 時間後に肘静脈より採血し heparin 1～2 滴を加えた全血液を試料とした。

(2). 三朝温泉入浴実験

温泉入浴は当研究所泉（含食塩重曹放射能泉）を使用した。被験者は 1 回浴では健康人男子 2 名、女子 3 名、合計 5 名であった。入浴前、及び入浴（42～43°C., 5 分間浴）30 分後に肘静脈より採血し heparin 1～2 滴加え試料とした。

連浴実験は温泉治療のため入院した患者 10

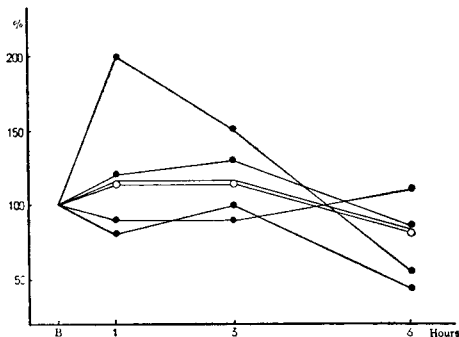
名(男. 6名, 女. 4名)について行った。入浴方法は1日, 2~3回, 42~43°C. の温泉に5~10分間浴とし, 入院時, 第3日, 第1, 2, 3及び4週目に早朝空腹時肘静脈から採血し, heparin 1~2滴を加えたものを試料とした。

Fig. 16 に示した如く血液 Cobalt 値は浴前に比べ増加2例, 不変2例, 減少1例で平均値に於てはほとんど変化を示さなかった。連浴実験では Table 22, Fig. 17 に示した如く, 血液 Cobalt 値は入浴開始前に比べ3

Table 20 Changes of cobalt in the blood after the internal use of a vitriol water "Yanahara"

Nome	Sex	Before	1	3	6 Hours
S. O.	♀	0.5	0.4	0.5	0.2 r/100ml.
T. T.	♀	0.4	0.8	0.6	0.2
K. T.	♀	1.0	1.2	1.3	0.8
M. I.	♂	0.9	0.8	0.8	1.0
Average		0.7	0.8	0.8	0.55
%		100	114	114	78

Fig. 15 Changes of cobalt in the blood after the internal use of a vitriol water "Yanahara"



〔3〕. 実験成績

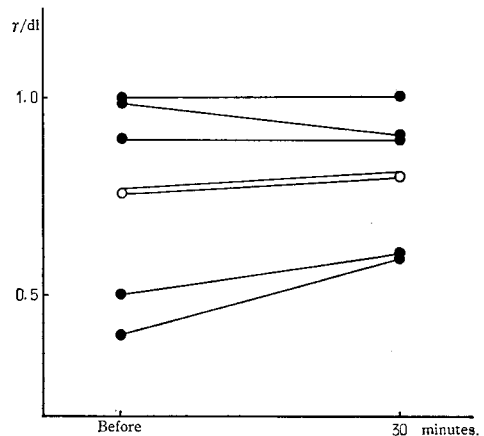
(1). 緑ばん泉飲用実験

緑ばん泉飲用による血液 Cobalt の変動は Table 20, Fig. 15に示した通りで, 飲用後1時間で最高 1.2r/100ml に達した例もあったが平均値では, 前 0.7r/100ml, 飲用後1, 3時間で 0.8r/100ml, 即ち14%の増加, 6時間後では 0.55r/ml で飲用前に比し22%減少した。

(2). 温泉入浴実験

研究所泉1回入浴後30分では Table 21,

Fig. 16 Blood cobalt levels before and after a single bathing.



~7日目に増加を示す症例が多く, 第2週目には増加を来すものもあったが逆に減少するも

Table 21 Changes of cobalt in blood following a single bathing.

Name	Sex	Before	30 minutes
T. Y.	♀	1.0	0.9 r/100ml.
T. O.	♀	0.9	0.9
E. I.	♀	0.4	0.6
T. I.	♂	0.5	0.6
M. I.	♂	1.0	1.0
Average		0.76	0.8

Table 22 Cobalt levels in blood before and after a series of baths in radioactive hot spring

Name	Sex	Age	Before	3	7	14	21	28	days
G. T.	♂	53	1.7		1.6	1.5	1.8	1.5	r/100ml
G. N.	♂	35	1.5	1.7	1.6	1.5	1.3	1.3	
T. O.	♀	54	1.4	1.3	1.4	1.3	1.2	1.5	
H. H.	♀	44	1.2		1.4	1.0	1.3	1.2	
K. A.	♂	35	0.9		1.2	0.9	1.0	1.1	
H. M.	♀	48	0.6	0.6	0.7	0.8			
K. N.	♀	29	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9	0.8	
A. M.	♀	66	0.3	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3	
S. S.	♂	36	1.4		1.6	1.3		1.6	
I. T.	♂	68	1.1	1.3	1.3	1.0	1.3	1.2	
Average			1.09	1.0	1.2	1.05	1.14	1.17	

のが多く、第3週目～第4週目には略々前値に復した。平均値でみると、3～7日目に5～10%増加、2週目4%減少となった。

〔4〕. 考察と結論

緑ばん泉飲用による血液 Cobalt の動きについて大島教授¹²⁾等は藤野鉱泉 50ml. を健康人1名に飲用せしめ、飲用前に測定出来なかったものが、2時間で0.3r/ml., 6時間で0.05r/ml 証明したと述べている。

著者の場合は健康人4名について実験した結果、Table 9 に示す通り1, 3時間後では飲用前にくらべ14%増加し、6時間では逆に22%の減少を認めた。即ち、若し飲用した鉱泉中の Cobalt が血液中にのみ平等に分布し

たとすれば、1, 3時間では飲用した Cobalt に相当する以上に増加している事になり、このことから体内の臓器(肝?)から Cobalt の動員が行われたと考えられる。

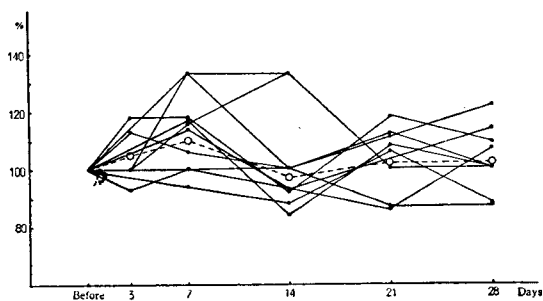
三朝温泉1回入浴では血液 Cobalt 値に認むべき変動は証明されなかったが、連浴実験では入浴開始後3～7日目に一過性増加、第2週目に減少、第3～4週目には浴前値に復した。

大島教授等¹⁰⁾は芦沢のデチゾンクロマトグラフ法で血中 Cobalt を測定し、健人血液1ml. では血中 Cobalt は証明出来なかったが、Acetyl-cholin 皮注により症例の2/5に、Adrenalin 皮注により1/5に Cobalt を証明、又、塩化コバルト 10mg. 乃至100r.

飲用後 Atropin 皮注で症例の7/8に Cobalt を証明出来ず Phenobarbital 皮注では血中 Cobalt の上昇を認めたことから、血液 Cobalt 値の上昇には自律神経殊に副交感神経が関与していると想像せられるという。著者の実験に於てもこの事実を確認し得た。⁴⁶⁾

さきに森永教授は⁴⁵⁾三朝温泉連浴実

Fig 17 Cobalt levels in human blood before and after radioactive thermal bath.



験で入浴開始後 4～6 日目には副交感神経緊張亢進を来すことを報告したが、著者の実験に於ても血液 Cobalt 値の変動を目安すると連浴初期に副交感神経緊張亢進を示すものと云えよう。血液 Cobalt 値の変動の意義については今後の研究にまたねばならぬ。

結 論

緑ばん泉飲用による血液 Cobalt の変動は

服用前に比し、1, 3 時間で 14 % 増加し 6 時間で 22 % 減少した。

研究所泉 1 回入浴による血液 Cobalt 値は浴後 30 分では殆んど変化を認めなかった。

連続浴に於ては入浴 3～7 日目に一過性の増加を、次いで第 2 週目にわずかに減少し、第 3～4 週では略々入浴開始前の値に復した。

摺筆するに臨み御指導と御校閲とを賜った森永教授に深甚の謝意を表する。

(本論文の要旨は第 20 回日本血液学会、第 23 回日本温泉気候学会、第 13 回日本内科学会中四国地方会に於いて口述し、医学と生物学 47(2) 1953 に速報した)。

主 要 文 献

- (1). T. Yoritaka et al: Nagasaki Igk. Z. 27 (1) 22, 1952.
- (2). H. Nakajima et al: Nagasaki Igk. Z., 29(9) 702, 1954.
- (3). Sandell, E. B., : Colorimetric determination of traces of metals. Intersci. Pub., New York, 2nd Ed.: 274a, 283b, 1950.
- (4). 山田正興, 久米道雄, 藤沢靖憲: 奈医誌. 8(2) 185, 1957.
- (5). R. M. Forbes, et al: J. Biol. Chem. 209(2):857, 1954.
- (6). 岡好良, 宮本正俊: 分析化学. 2: 322, 1953.
- (7). 芦沢峻: 岡大温研報, (5): 1, 1951.
- (8). 鳥居鉄也: 日化. 76(3) 328, 1955.
- (9). 吉川秀男, 荻田善一: 化学, 10 (1) 77, 1955.
- (10). 大島良雄, 他: 日内会誌. 44 (5) 377, 1955.
- (11). H. Wolff: Klin. Wochschr., 28:280, 1950.
- (12). 大島良雄, 芦沢峻: 岡大温研報, (13) 15, 1953.
- (13). 森五彦, 小林茂三郎: 濾紙電気泳動法の実際. 南江堂. 東京. 1956.
- (14). 阿部潔: 医学と生物学. 37 (2) 64, 1955.
- (15). E. C. Hunt, A. A. North & R. A. Wells: Analyst. 80:172, 1954.
- (16). W. Joe Frierson & Dorothy A. Rearick: Anal. chem. 30 (4) 468, 1958.
- (17). G. H. Morrison & H. Freiser: Solvent extraction in analytical chemistry, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1957.
- (18). W. F. Hillebrand & G. E. F. Lundell, H. A. Bright, M. S. J. I. Hoffman: Applied inorganic analysis, 2nd Ed. 417, John Wiley & Sons, Inc. New York, 1953.
- (19). 石橋丸応: 岡大温研報, (22) 37, 1958.
- (20). K. Waltner, & K. Waltner, : Klin. Wschr., 8, 313, 1929.
- (21). H. Wolff: Die Pharmazie. 7 (4) : 206, 1952. 医学のあゆみ, 14: 301, 1956 による。
- (22). C. J. Gubler, et al: J. Biol. Chem., 184: 575, 1950.
- (23). 久米田克哉: 岡山医会誌, 70 (6) 2205, 昭 33.
- (24). マツカラム: 栄養新説, 239, 朝倉書房. 東京. 昭 23.
- (25). E. J. Underwood: Trace elements: 178, Academic Press, New York, 1956.

- (26). 長谷川吉康: 日内会誌, 44:534, 1955.
- (27). 山本巖, 他: 日内会誌, 45:431, 1956.
- (28). Heilmeyer u. Begemann: Handb. d. Inn. Med. Bd II. 1951.
- (29). Parke-Davis: Therapeutic note:65 (4) 80, 1958.
- (30). R. M. Forbes et al: J. Biol. Chem. 209 (2) 857, 1954.
- (31). C. D. Comar & G. K. Davis: J. Biol. Chem. 170:379, 1947.
- (32). H. Behrendt: Chemistry of erythrocytes, 中尾, 高橋, 三輪訳. 医歯薬, 東京. 1958.
- (33). 河方延介: 産科と婦人科, 23:224, 1956.
- (34). 堀田正之: 新薬と臨床, 5 (4) 47, 1956.
- (35). 高杉年雄, 他: 診療, 9 (9) 77, 1956.
- (36). 赤木弘昭: 内科宝函, 4:1002. 1957.
- (37). 菊地武彦, 他: 綜合臨床, 5:347, 1956.
- (38). 鳥居鉄也: 日化, 76 (6) 707, 1955.
- (39). Vogt: Fäder u. Klimaheilkunde II. : 484, 1940.
- (40). 木村健二郎: 化学実験学第1部 地球化学, 河出書房. 東京. 648. 1942.
- (41). 川上弘泰, 他: 温研紀要, 7 (4) 238, 1955.
- (42). 川上弘泰, 他: 温研紀要, 特別号 IV. 1956.
- (43). 小谷徳郎: 日温気会誌, 8 (2~3) 208, 昭17.
- (44). 外園正純: 日温気会誌, 16 (3) 9と28, 昭27.
- (45). 森永寛: 放研報, (2) 20, 昭24.
- (46). 石橋丸応, 森永寛: 第56回日内会総会口演, 昭34. 4.

Studies on Paper-analysis in the Field of Balneology.

- (II) 1. A New Method for the Determination of Cobalt in Blood.
- 2. Effects of Radioactive Thermal Bathing and Internal Use of Vitriol Water upon Cobalt Levels in Blood.

Maruo ISHIBASHI

Division of Internal Medicine, Balneological Institute,
Okayama University

1. A new method for the determination of cobalt in blood.

The author proposed a new method for the determination of cobalt in blood by means of paper-chromatography. The procedure is follows.

In a Kjeldahl colben, 5 ml. of blood is taken, and turned into wet ash with 3 ml. of HNO_3 , 0.5 ml. of H_2SO_4 and 1.5 ml. of HClO_4 and the ash aqueous solution is then neutralized with ammonium hydroxid, the neutralization being indicated by the development of color of 0.1% of p-nitrophenol (one drop) added to the solution. After addition of 2 ml. of 40% ammonium citrate, 0.5 ml. of 20% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 3~5 drops of H_2O_2 and 1 ml. of o-nitrosoresorcine monomethyl ether (hereafter N. R. M. E.), the mixture is left for at least 15 minutes and the aqueous solution is taken in a stoppered test tube (inside diameter: 1.3 cm., hight: 16.5 cm.). The mixture is

shaken with 2 ml. of carbon tetrachloride. Carbon tetrachloride is shaken with 5 ml. of 20% Na_2CO_3 solution. Then the excess of N.R.M.E. is removed and carbon tetrachloride is concentrated on water bath to 0.3~0.5 ml. and all CCl_4 is used for a determination sample. The sample is placed on the paper (Tōyō-filter paper No. 50 or 51A) in a thin line at a distance of 3 cm. from the edge, and the spot is developed with a mixture of 20 ml. of CCl_4 and 1 ml. of 90% ethylalcohol. After development for 30~40 min., an orange-colored linear spot appears at a distance of 9~10 cm. from the origin point. Spot intensity is measured at 460 $\text{m}\mu$ with Natsume's densitometer and quantitative estimation is made comparing with the standard graph.

2. Effects of radioactive thermal spring bathing and internal use of vitriol water upon cobalt levels in blood.

As the author's method above-mentioned is able to determine the cobalt level in a small amount of blood, it is very convenient in investigating cobalt metabolism in the field of balneology.

The author examined the changes of cobalt levels in blood after radioactive thermal bathing as well as after internal use of acid vitriol water.

a. By the author's method cobalt in normal human blood was 0.4~3.6 γ /100ml. in man (average: $1.6 \pm 0.4\gamma$ /100ml.) and 0.2~2.2 γ /100ml. in woman (average: $0.7 \pm 0.3\gamma$ /100ml.).

b. The cobalt levels in blood were measured by the author's method before and 5, 30, 60 minutes after the radioactive thermal single bathing, and before and 1, 2, 3, 4 weeks after a series of radioactive thermal baths (Rn-content: 10~30 Mache, 42~3°C., for 10 minutes).

The cobalt levels in the blood of healthy subjects showed no significant change after the thermal single bathing, but those of patients with rheumatoid arthritis showed a slight increase on 3rd or 7th day and a fall on 2nd week of a series of radioactive thermal baths and then tended to return to the initial levels during the 3rd and 4th weeks of spa treatment.

c. Thirty ml. of Yanahara mineral water (an acid vitriol water, pH: 2.2) was diluted with plain water to 200 ml. (Co^{++} content: ca. 3 γ) and administered to healthy fasting subjects orally.

Blood samples were taken from the cubital vein before and 1, 3, 6 hours after the intake of the vitriol water. The cobalt levels in the blood showed an increase of 14% of the initial levels at 1 and 3 hours and a decrease of 22% at 6 hours after the drinking of Yanahara mineral water.